

⑨ Int. Cl.<sup>5</sup>A 01 N 1/02  
A 61 K 35/18

識別記号

A B Z

庁内整理番号

7043-4H  
8615-4C

⑬ 公開 平成3年(1991)3月27日

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全7頁)

⑭ 発明の名称 赤血球細胞の凍結乾燥法

⑮ 特 願 平1-221399

⑯ 出 願 平1(1989)8月28日

優先権主張 ⑰ 1988年8月26日 ⑱ 米国(US) ⑲ 237588

⑳ 発 明 者 レイモンド ボール アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91106 パサディナ  
グッドリッチ 201 ノース ウイルソン 171㉑ 発 明 者 クリステイン マリー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91106 パサディナ  
ウィリアムズ 313 コードヴァ ストリート 1115㉒ 発 明 者 ロバート エス フラ アメリカ合衆国 オハイオ州 45230 シンシナチ サン  
ンコ ドクリフ ドライブ 1825㉓ 出 願 人 クライアフォーム コ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91107 パサディナ  
ーポレーション ニーナ ストリート 2585

㉔ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外7名

最終頁に続く

## 明 細 書

1. 発明の名称 赤血球細胞の凍結乾燥法

2. 特許請求の範囲

1. 約7.0から37.5%の濃度で溶液に添加される単糖類；約0.7%から飽和に至る濃度で溶液に添加される約1Kから約360Kの分子量を有する高分子；0.01重量%から飽和に至る濃度で溶液に添加されるポリアニオンを含有する緩衝溶液に多数の赤血球を浸し；前記溶液を冷凍し；かつ水分を昇華させて赤血球を乾燥させることを含む、赤血球の凍結乾燥法。

2. 前記した高分子が両親媒性である、請求項1に記載の方法。

3. a) 約7.0から37.5%の濃度で溶液に添加される、キシロース、グルコース、リボース、マンノース、及びフルクトースからなる群より選択される単糖類；

b) 少なくとも0.01重量%の濃度で溶液に添加される、ピロリン酸、三リン酸、リン酸化したイノシトール、2, 3-ジホスホグリ

セリン酸、アデノシン三リン酸、リン酸化したデキストラン、ヘパリン及びポリカルボン酸からなる群から選択される生物学的適合性ポリアニオン；

c) 少なくとも0.7%の濃度で溶液中に添加される、ポリビニルピロリドン及びデキストランからなる群より選択される高分子；

を含む緩衝溶液中に多数の赤血球を浸し；前記の溶液を冷凍し；水分を昇華させて赤血球を乾燥させることを含む、細胞膜を有する赤血球の凍結乾燥法。

4. 約7.0から37.5%の濃度で溶液に添加される単糖類；少なくとも0.7%の濃度で添加される約1Kから約360Kの分子量を有する高分子；及び0.01重量%以上の濃度で添加されるポリアニオンを含有する溶液を含む、赤血球の凍結乾燥用媒質。

5. 前記の高分子が両親媒性である、請求項4に記載の媒質。

6. 約20重量%に至る濃度の約1Kから約360

Kの分子量を有する高分子を含有する水溶液に、凍結乾燥した細胞を接触させる工程を含む、凍結乾燥した細胞の再形成方法。

7. 前記の高分子が両親媒性である、請求項6に記載の方法。

### 3. 発明の詳細な説明

本出願は、1988年8月26日に提出した米国出願番号第237,588号の一部継続出願である。本発明は、生化学、及び医科学の広範な分野、及び特に赤血球細胞の保存、貯蔵、及び再形成方法に関する。

血液は人間の主要な組織であり、かつ肺から末梢組織へ酸素を供給するための支配的な役割を有している。前記の役割は、赤血球すなわち、赤血球細胞(RBC)によって遂行される。酸素は、肺からヘモグロビンと呼ばれる赤く、鉄を含有するタンパク質により遂行される交換-拡散系により供給される。ヘモグロビンが酸素と結合してオキシヘモグロビンが形成され、酸素が組織に渡された後オキシヘモグロビンはデオキシヘモグロビンに還元される。

赤血球細胞膜は、膜二重層及び細胞骨格という2つの主要な構造単位を含む。脂質二重層及び膜内在タンパク質は、膜二重層を形成し、ほとんど構造的な強度を有せず、また小胞形成によって即

時に細片化する。他の主要な成分である膜骨格は膜二重層を安定化し、かつ変形に対する抵抗力を提供する。前記した細胞骨格は、おそらくタンパク質-タンパク質の結合ばかりではなく脂質タンパク質の結合によっても赤血球膜中の二重層に連結される。前記したヘモグロビン、及び他のRBC成分が赤血球細胞膜に含有されている。

成人では、骨髓に新鮮な赤血細胞の形成作用がある。赤血球が血液に混入されれば、該細胞は約120日の平均寿命を有する。平均的な人間では、毎日約0.83%の赤血球が食作用、溶血若しくは機械的な損傷によって破壊され、また除去された分の細胞が骨髓により補充される。

広い種類の外傷及び医療上の処置において全血液若しくは種々の血液成分の輸血が必要とされている。全ての患者が全血液を必要とするわけではなく、かつ実際的には、全血液成分の存在によって医療上の問題が生ずる。個々の血液分画を輸血時にその生物学的活性を保証するのに最適な特定の条件下で貯蔵することができる。例えば、処理

センターで供血者の血液が提供される場合、赤血球が分離されかつ種々の方法で貯蔵される。前記の細胞は、通常200から300 mlの容量及びヘマトクリット値(血球容量%として)・70から90を有する封入された単位としてクエン酸-リン酸-デキストロース中で4℃で5週間に至るまで貯蔵可能である。また、赤血球をグリセリンで処理し、その後-30℃から-196℃で冷凍してグリセリン溶液中で7年に至るまで貯蔵することも可能だが、輸血のために十分に生存させるため、低温で冷凍させておかなければならない。前記の双方の方法は、赤血球の望ましい生物学活性の崩壊を避けるために貯蔵温度を注意深く維持することが必要であり、また輸血された細胞の少なくとも70%が24時間の生存時間を与えるが、それはアメリカ血液銀行規格に従い、輸血業務における使用に対して許容可能であると考えられる。

前述した様に、赤血球細胞の特定の貯蔵温度、若しくは他の貯蔵条件の維持に依存しない貯蔵方法が必要とされている。前記の方法によって医療

用赤血球の利用が容易となる。

前述した所望の方法の1つとしては、細胞が長期間にわたり室温で貯蔵でき、かつ哺乳動物に対する使用にあたって容易に再形成できるということから、赤血球細胞の凍結乾燥法（冷凍乾燥法）が挙げられる。しかしながら、本発明以前には、完全な細胞骨格及び生物学的に活性なヘモグロビン、すなわち生存可能な赤血球細胞を形成するように細胞を再形成することが可能な方法で赤血球を冷凍乾燥することは不可能であった。従来技術に従ってRBCを凍結乾燥する場合には、例えば水溶液若しくはリン酸緩衝生理的食塩水溶液のいずれか中で再形成された細胞は代謝を営めなくなる程破壊されてしまい、その細胞のヘモグロビンは酸素を運搬することはできない。凍結乾燥されかつ再形成されたグルタルアルデヒド固定赤血球は、主に凝集反応分析に使用できることが見出されている。

本発明の方法によれば、細胞の構造及びヘモグロビンの生物学的な活性を維持する条件下で赤血

球を凍結乾燥でき、かつ医療水準で使用されうる凍結乾燥された赤血球の再形成が可能となる。簡潔には本方法は、炭水化物、好ましくは両親媒性の生物学的に適合する高分子、及び多数のアニオン基を有する生物学的に適合する化合物、すなわちポリアニオンを含有する生理学的に緩衝された水溶液に多数の赤血球を浸すことを含む。用語「両親媒性」とは、単一の分子に、疎水性及び親水性部分を有するものを意味する。前記した浸漬の後前記の溶液を冷凍し、かつ冷凍した溶液を乾燥させて、再形成後に著しい割合で生存可能な赤血球を製造する冷凍乾燥された赤血球が得られる。

本発明の炭水化物としては、細胞に対して生物学的に適合するもの、すなわち、細胞を破壊しないものが挙げられ、また細胞膜を透過若しくは透過可能なものが好ましい。前記した炭水化物は、二糖類では有意な程度で膜を透過しないことから、単糖類から成る群から選択することができる。ペントース及びヘキソースで約7.0から37.5%、好適には約23%の濃度であるものが好ましい。

キシロース、グルコース、リボース、マンノース及びフルクトースが特に効果的に利用される。

前記の高分子は、溶液中に0.7%から飽和に至る濃度で添加することができ、約1Kから約360Kの範囲の分子量を有する。前記高分子の分子量は、好ましくは約5Kから80Kの範囲のものであり、約5Kから約50Kの分子量のものが最も好ましく、また溶液中に約3.6%から前記高分子の溶解度の上限に至る濃度で添加される。ポリビニルピロリドン（PVP）、及びポリビニルピロリドン誘導体とデキストラン及びデキストラン誘導体からなる群から選択される高分子が著しく効果を与える。例えばポロキサマー（poloxamers）の様な他の両親媒性の高分子をそれらの種々の形態のいかなるものにおいても使用することができる。アミノ酸による高分子（すなわち、タンパク質）若しくは、ヒドロキシエチルスターチもまた、利用可能である。赤血球細胞の凍結乾燥において、炭水化物-高分子溶液を使用することによって、生物学的に活性なヘモグロビンを含む完全な細胞

が著しい割合で再生される。いかなる理論へ関係づけることを意図するものではないが、前記の高分子の両親媒特性によって、水性の環境へ親水性の部分を伸展させることによって膜表面を保護すると同時に細胞膜に固着させるのである。これによって例えば細胞の凝集といった他の問題を生じる細胞膜の損傷が軽減されるのである。

ポリアニオンとしては、赤血球の細胞膜を破壊しないものが挙げられ、多価のリン酸基、硫酸基若しくはカルボン酸基が好ましく、前記溶液中に0.01重量%から飽和に至る量で添加することができるが、約0.1から約1.0%の最少濃度が効果的である。前記のポリアニオンがリン酸基、硫酸基、若しくはカルボン酸基であるアニオン基を有することがより好適である。特に、ピロリン酸、三リン酸、リン酸化したイノシトール（三リン酸イノシトール及び6リン酸化イノシトールを含む）、2,3-ジホスホグリセリン酸、アデノシン三リン酸、及びヘパリンが著しく効果的に利用できる。前記した多数のアニオン基が高分子及びポリア

ニオンの双方のに存在する、前述した様な高分子性化合物を使用することから付加的な利点が生ずる。デキストラン誘導体、例えばリン酸化したデキストランの使用は、高分子であることの利点及びまた、前記した溶液中でポリアニオンを提供することから効果的である。それ故にリン酸化したデキストランの様な化合物は、高分子及びポリアニオンと同等に機能する。

後述するデータにより示される様に、前記した溶液によって赤血球細胞が、冷凍、水分昇華、及び再形成などのストレスにさらされることを可能とし、かつ哺乳動物中で赤血球として機能することのできる細胞が得られるように再形成し得る媒質が提供される。

専門用語、若しくは文脈により他の指示がなされない限り、本明細書中で前記した全ての割合は重量パーセント（すなわち、溶液全重量に対する溶質の重量）を示す。

前述した様に、本発明の方法によって凍結乾燥及び完全かつ生物学的に活性な赤血球の再形成に

使用される媒質が提供される。本発明の媒質は新規であるが、装置及び関連する技術については、種々の材料の凍結乾燥法で当業者に周知であることが了解されるので、ここでは具体的な生物学的試料、及び特有の温度のみ、及び本実施例で利用した装置について記載する。この記載によって当業者は、冷凍乾燥及び完全でかつ生存可能な赤血球細胞の再形成方法についての本発明の媒質が利用可能となる。

用語“凍結乾燥”とは広く、物質を冷凍し、及びその後、ある成分、すなわち水の濃度を生物学的若しくは化学的反応を維持しない水準にまで昇華若しくは放出によって減少させることとして定義される。通常、乾燥工程は高真空中で達せられる。しかし細胞、具体的には赤血球の貯蔵に関しては、乾燥の度合い（残留水分量）が細胞の室温における長期の貯蔵に耐える能力に対して決定的に重要である。本発明の方法においては、残留水分量が10%未満、好ましくは5%未満、及び最も好ましくは3%未満にまで凍結乾燥される。

#### 例 1

封入した生存可能血液の赤血球細胞を病院の血液提供センターから得るか、若しくはヘパリンを抗凝固剤として健康なボランティアから採血した。

前記血液細胞を再生した試料をリン酸で緩衝した生理的食塩水（10 mMの1-及び2-塩基リン酸ナトリウム、150 mMの塩化ナトリウム、5 mMのデキストロス、及び10 mMのアデノシン、pH 7.2）を使用し 14,000 rpm の6から10秒の遠心分離を3回行なって洗浄し、プラスマ及び／若しくは赤血球細胞に由来する他の型の細胞を分離した。

前記した封入された赤血球細胞の試料をその後、pH 7.2のPBS若しくは脱イオン水中に21.7から26.3%のグルコース、18.1%10 K若しくは12.8%24 Kのポリビニルピロリドン、及び2.3%の6リン酸化イノシトール（IHP）を含む凍結乾燥用緩衝液中に懸濁させた。

前記した懸濁液をその後フラスコへ移し、続いて試料が冷凍するまで液体窒素（-196℃）中

に浸した。前記したフラスコを液体窒素中でむらなく回転し、フラスコ壁上に溶液を均等に分散させた。

冷凍した試料を内室が-56℃で100 μm Hg未満で作動している卓上凍結乾燥器（bench top lyophilizer）、ラブコンモデル4.5（Labconco model 4.5）へ移した。試料を結晶化してもろくなるまで完全に乾燥させてから（6-24時間）、前記のフラスコを室温に戻した。

前記の試料を、リン酸で緩衝した生理的食塩水中に25.5%のスクロースを含有する溶液を使用して、37℃で再水和させた。再水和させる溶液を、乾燥前の試料の初期容量と同等な容量まで加えた。

前記の試料をエッペンドルフ（Eppendorf）型の小型遠心分離機中で14,000 rpmで遠心分離し、懸濁液中の再水和赤血球細胞をペレット化した。

結果を次の様に示す。

表 I

高分子	ポリ アニオン	細胞 再生	Hb 再生
18.1% 10K PVP	2.3% IHP	52.4 ± 9.7	39.2 ± 8.6
18.1% 10K PVP	—	50.4 ± 10.8	38.3 ± 10.3
12.8% 24K PVP	2.3% IHP	62.0 ± 10.2	61.7 ± 5.1
12.8% 24K PVP	0.7% ピロ リン酸	64.6 ± 10.4	66.9 ± 4.9
12.8% 24K PVP	—	56.2 ± 7.7	57.5 ± 3.8

PBS 単独で凍結乾燥した赤血球細胞では、0%の細胞再生及び0%のヘモグロビン再生という結果であった。

## 例 2

凍結乾燥用緩衝液中のグルコースを他の炭水化物に置換えて例 1 に記載した方法をくり返し実施

## 例 3

例 1 に記載の方法を前述の実施例の凍結乾燥に使用したものと異なる分子量及び濃度のポリビニルピロリドンに置換えてくり返し実施した。示したものを除き、他の全ての条件は、例 1 に記載した通りである。結果を次の様にまとめる。

表 III (a)

分子量	濃度 (%)	細胞 再生%	Hb 再生%
40K	6.8	48.4	43.0
	18.1	44.8	42.2
	6.8	42.3	38.4
	18.1	49.7	53.9
360K	3.5	40.3	35.1

本例での 1.4% 360K の PVP の使用によれば、完全に細胞が溶解し、かつヘモグロビンは再生されなかった。

した。示したものを除き、他成分及び条件は、例 1 に記載したものと同等である。結果を次の様にまとめる。

表 II

高分子	炭化水素	Hb 再生% W/O ポリアニオン	Hb 再生% W/ポリアニオン
18.1% 10K PVP	マンノース	30.6	49.6 *
	キシロース	32.3	55.0 *
12.8% 24K PVP	マンノース	55.9	70.1 **
	キシロース	57.2	62.4 **

\* IHP 2.3%

\*\* ピロリン酸 0.7%

凍結乾燥用溶液中のトレハロース、スクロースが細胞再生の上限を示したが、ヘモグロビンは再生されなかった。マルトースは、細胞若しくはヘモグロビンの再生は見られなかった。

表 III (b)

分子量	濃度 (%)	Hb 再生% W/O ポリアニオン	Hb 再生% W/O.7% ピロリン酸
10K PVP	3.5	13.6	19.2
	6.8	15.0	32.7
	12.8	30.1 ± 4.1	26.5
	18.1	38.3 ± 10.3	47.7
24K PVP	3.5	24.7	36.5
	6.8	52.9	41.8
	12.8	52.7 ± 6.3	66.9 ± 4.9
	18.1	52.2 ± 6.9	72.1

## 例 4

例 1 に記載した実験を、凍結乾燥用緩衝液中でポリビニルピロリドン以外のポリマーを使用して実施した。その結果を次の様にまとめる。

表 IV

	分子量	濃度 (%)	細胞再生%	Hb再生%
<u>高分子</u>				
デキストラン	10K	18.1	43.9	20.3
	40K	18.1	39.3	21.9
	80K	6.8	47.6	11.1
フィコール (Ficoll)	400K	3.5	46.2	18.7
リン酸化デキストラン	40K	6.8 *	56.8	37.0
<u>タンパク質</u>				
アルブミン		6.8	60.4	29.6
フィッシュゼラチン		6.8	39.3	28.4

\* NMRによれば、リン酸化した高分子中では本試料は、99%のデキストラン及び約1%の残留グルコースを含む。

## 例 6

凍結乾燥用緩衝液中のポリアニオンとして6リン酸化イノシトール若しくはピロリン酸以外のものを使用して、例1に記載した実験をくり返し実施した。他の条件は例1に記載したものと同一である。結果を次の様に記載する。

表 VI

ポリアニオン	濃度 %	Hb再生%	細胞再生%
三リン酸	1.0	60.7	64.6
三メタリン酸	0.8	10.4	26.5
ATP	0.5	62.7	70.9
2,3 DPG	0.7	64.1	59.4

ATPは、アデノシン5-三リン酸を示し、及び2,3 DPGは2,3-ジホスホグリセリン酸を示す。

前述したことから、当業者は本発明の本質的な

## 例 5

例1に記載した実験を18.1%10KのPVPのもとで、6リン酸化イノシトール及びピロリン酸の濃度を変更してくり返し実施した。他の条件は例1に記載した通りである。結果を次の様にまとめる。

表 V

ポリアニオン	濃度 (%)	Hb再生%	細胞再生%
ピロリン酸	0.09	37.6	56.5
	0.22	39.4	57.3
	0.45	62.3	63.0
	0.90	61.0	64.4
	1.8	54.4	56.2
	4.5	24.0	33.7
IHP	0.009	30.2	67.3
	0.09	42.6 ± 3.7	50.3 ± 6.1
	0.22	50.3 ± 6.9	55.4 ± 4.0
	0.45	52.4 ± 12.8	52.7 ± 12.8
	0.9	58.3 ± 16.4	51.9 ± 2.7
	1.8	45.0 ± 5.4	55.5 ± 3.9
	4.5	34.7 ± 2.7	52.5 ± 1.0

特徴を容易に確認することができ、また本発明の精神及び範囲から脱することなしに種々の用法及び条件に対して本発明を適用することができる。形態の形更及び均等物による置換が、環境に応じ若しくは環境に応じて手段が講じられる様になされても良くまた、本明細書では特定の用語を利用したが、それらは記述のうへで使用したものであり本発明の目的を制限するものではない。

第1頁の続き

⑦発明者

マーリイ ウエイナー

アメリカ合衆国 オハイオ州 45242 シンシナチ スポ  
ーキー リッジ レーン 8915

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**